УДК 619:579

Ю.Б. Никульшина, Д.Г. Сверкалова, Е.Н. Никулина
(ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия», Ульяновск)

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ BORDETELLA BRONCHISEPTICA, ВЫДЕЛЕННЫХ У ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ

Введение

В зарубежной научной литературе появляется все больше сообщений о распространении бордетеллезной инфекции среди собак и кошек в Западной Европе, Нидерландах, Великобритании, США. Ученые этих стран внимательно следят за распространением инфекции, разрабатывают диагностикумы, методы лечения и профилактики [3, 5, 7, 10].

Проблема распространения бордетеллёзной инфекции крайне актуальная, так как учёными установлено, что *Bordetella bronchiseptica* может явиться причиной инфекционных заболеваний и у людей, передаваясь им от животных [4, 5, 6, 9].

Риск возможной передачи бордетеллёзной инфекции от животных людям впервые предположили в 1962 году, а позднее ученые подтвердили это предположение [8, 9]. В последующем зарубежные исследователи доказали возможность передачи микроорганизма от кролика человеку [6]. Известны случаи передачи инфекции от кошек человеку [8]. Восприимчивость к инфекции человека и его тесный контакт с собакой делает возможным их взаимное заражение.

В большинстве случаев бордетеллёз людей связывали с иммуннодепрессивным состоянием пациентов и в анамнезе не учитывали возможный контакт этих людей с больными животными [4, 5].

В нашу страну в последние десятилетия, с целью разведения новых пород, собак и кошек интенсивно завозят из-за границы. Это является предпосылкой для возникновения новых, малоизученных, остропротекающих и ассоциированных заболеваний. Особую актуальность приобретают инфекции, причиной которых служат многочисленные пассажи и накопление микрофлоры в организме животных – такие, как бордетеллёзная инфекция.

Следует отметить, что указанная болезнь в нашей стране недостаточно изучена и диагностируется как патология невыясненной этиологии. Методы лабораторной диагностики бордетеллёза собак не разработаны, что создает большую сложность в своевременной и точной диагностике.

Вследствие этого целью данного научного исследования явилась разработка схемы выделения и культивирования *B. bronchiseptica* от домашних животных.

Материалы и методы

Работа проводилась в Научно-исследовательском инновационном центре микробиологии и биотехнологии (НИИЦМиБ) кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГОУ ВПО «Ульяновская ГСХА».

Схема научно-исследовательской работы включала разработку бактериологических методов индикации и идентификации возбудителя бордетеллёза домашних животных.

Морфологические, культуральные и биохимические свойства бордетелл изучали согласно общепринятым в микробиологии методикам [1].

При разработке методики выделения бордетелл от домашних животных были подобраны собаки с клиническими признаками трахеобронхита: выраженное угнетение, температурная реакция, чихание, кашель, выделения из носовых отверстий (n=9). Для типизации *Bordetella bronchiseptica* использовали среды: бордетелл-агар, Эндо, МПА, триптиказно-соевый бульон, МПБ, набор сахаров Гисса, тесты на подвижность, оксидазу, индол, микроскопию с окраской по Граму.

Собак фиксировали при взятии проб из носовой полости в стоячем или сидячем положении, удерживая голову одной рукой за кожную складку на шее, а другой – за челюсти. При взятии проб из глотки в стоячем или сидячем положении - разводя челюсти руками или с помощью инструментов.

Для выбора наиболее эффективной методики испытали несколько схем выделения и культивирования *B. bronchiseptica* от собак.

Таблица 1

Оценка роста микроорганизмов на триптиказно-соевом бульоне

№ п/п	Проба	Равномерное помутнение	Придонный рост	Пристеночный рост	Поверхностный рост (кольцо)
1.	Б№1	+	+	-	+
2.	Б№2	+	+	-	+
3.	Б№3	+	+	-	-
4.	1С№1	+	-	-	-
5.	1С№2	+	+	-	+
6.	2С№1	-	+	-	-
7.	Ф№1	+	+	-	+
8.	Ф№2	+	+	-	+
9.	Ф№3	+	+	-	+

Таблица 2

Оценка колоний на бордетелл-агаре

№ п/п	Величина	Форма	Контур края	Рельеф	Поверхность	Цвет	Структура	Консистенция
1.	0,5-2,0 мм	округлая	ровный	конусообразный	блестящая	бело-серый	прозрачная	слизистая
2.	до 2,5 мм	округлая	ровный	конусообразный	блестящая	белый	прозрачная	слизистая
3.	до 3 мм	округлая	ровный	выпуклый	гладкая	белый	прозрачная	слизистая
4.	до 4 мм	округлая	ровный	конусообразный	гладкая	белый	прозрачная	слизистая
5.	до 2,5 мм	округлая	ровный	конусообразный	блестящая	бело-серый	прозрачная	слизистая
6.	от 0,3 до 0,5мм	округлая	ровный	конусообразный	блестящая	бело-серый	прозрачная	слизистая
7.	до 1 мм	округлая	ровный	конусообразный	блестящая	бело-серый	прозрачная	слизистая
8.	до 2 мм	округлая	ровный	конусообразный	блестящая	бело-серый	прозрачная	слизистая
9.	до 2 мм	округлая	ровный	конусообразный	блестящая	бело-серый	прозрачная	слизистая

Схема №1 включала взятие проб – мазков из назальной впадины собак. Для этого использовали стерильные ватные палочки и триптиказно-соевый бульон. Палочки помещали в носовые ходы собак на глубину 2-4 см и совершали несколько вращательных движении, касаясь внутренней стенки носовой полости. После взятия материала пробы подращивали в термостате при t 37°С в течение суток. Затем осуществляли оценку роста на триптиказно-соевом бульоне и проводили посев на разработанную селективную среду - бордетелл-агар с цефазолином. На 2-3 сутки оценивали рост колоний, выделяли чистые культуры методом посева штрихом и изучали морфологические, биохимические и культуральные свойства выделенных микроорганизмов.

Схема №2 включала взятие проб из глотки собак непосредственно на селективную среду. Для этого использовали стерильные ватные палочки и разработанную селективную среду - бордетелл-агар с селективными компонентами.

Мазок брали с задней стенки глотки собак, совершая несколько вращательных движений. Тампон вводили в задние отделы ротовой полости, избегая прикосновения к слизистой оболочке щек, языка, и проводили 2 –3 раза по задней стенке глотки. Для получения изолированных колоний посев проводили путем втирания тампона по периферии чашки, а затем Z-образными штрихами в центре. Среди выросших колоний выбирали подозрительные и отсевали на отдельные чашки. Чашки оставляли при 37° С на 2-3 суток. Рост проявлялся через 48-72 часа. Затем выделяли чистые культуры и ком-

Таблица 3

Морфологические и культуральные свойства полевых штаммов

№ п/п	Проба	Окраска по Граму	Форма бактерий	Подвижность	Рост на средах			
					Эндо	ТСА	МПБ	ТСБ
1.	Б№1	«-»	кокки	+	+	+	+	+
2.	Б№2	«-»	кокки	+	+	+	+	+
3.	Б№3	«-»	кокки	+	+	+	+	+
4.	1С№1	«-»	кокки	+	+	+	+	+
5.	1С№2	«-»	коккобацилла	+	+	+	+	+
6.	2С№1	«-»	бацилла	+	+	+	+	+
7.	Ф№1	«-»	коккобацилла	+	+	+	+	+
8.	Ф№2	«-»	коккобацилла	+	+	+	+	+
9.	Ф№3	«-»	коккобацилла	+	+	+	+	+

Таблица 4

Биохимические параметры полевых штаммов

№ п/п	№ п/п	Малый «пёстрый» ряд сахаров Гисса					индол	оксидаза
		глюкоза	лактоза	маннит	мальтоза	сахароза		
1.	Б№1	+	-	-	+	-	-	+
2.	Б№2	+	-	-	+	-	-	+
3.	Б№3	+	-	-	+	-	-	+
4.	1С№1	+	-	-	+	-	-	+
5.	1С№2	-	-	-	-	-	-	+
6.	2С№1	-	-	-	-	-	-	+
7.	Ф№1	-	-	-	-	-	-	+
8.	Ф№2	-	-	-	-	-	-	+
9.	Ф№3	-	-	-	-	-	-	+

плексно изучали их свойства.

Для типирования выделенных от животных микроорганизмов использовали определитель бактерий Берджи [2].

На основании испытанных схем выделения бордетелл от домашних животных разработали методику индикации и идентификации *Bordetella bronchiseptica*.

Результаты и обсуждение

В результате проведения опыта по первой схеме после суточной инкубации на триптиказно-соевом бульоне во всех пробах регистрировали обильный рост микроорганизмов (табл. 1).

Из данных табл. 1 видно, что 6 из 9 исследуемых проб вызывали равномерное помутнение триптиказно-соевого бульона с последующим образованием осадка и пристеночного поверхностного кольца, что характерно для *Bordetella bronchiseptica*.

Результаты дальнейшего посева бульонных культур на бордетелл-агар с цефазолином с суточной инкубацией при температуре 37° С в термостате не дали положительных результатов выделения *Bordetella bronchiseptica*. Был отмечен обильный рост условно-патогенной флоры, в основном грибковой природы.

По нашему мнению, произошла утеря искомого возбудителя вследствие следующих факторов:

• носовая полость активно взаимодействует с микрофлорой окружающей среды, поэтому в ней содержится большое количество условно-патогенной флоры, обильно размножающейся в триптиказно-соевом бульоне при заборе проб и, возможно, ингибирующей *Bordetella bronchiseptica;*

• при отборе проб и суточной культивации штаммам *Bordetella bronchiseptica* недостаточно ростовых и питательных веществ в триптиказно-соевом бульоне, например, угольных компонентов;

• разработанная селективная среда – бордетелл-агар с цефазолином – не предотвращает рост грибковой флоры, попадающей в пробы из носовой полости и окружающей среды.

Учитывая вышеприведённые доводы во второй серии опытов, мы попытались учесть эти факторы.

При проведении опыта по схеме №2 были получены следующие данные.

Результаты культивирования отдельных колоний на плотной селективной среде – бордетелл-агаре представлены в табл. 2.

На селективной среде характерный рост для рода *Bordetella* (маленькие, блестящие, полупрозрачные, серовато-белые колонии диаметром 0,2-2,5 мм) показали 7 культур.

Результаты изучения морфологических и культуральных свойств колоний представлены в табл. 3. По морфологическим и культуральным свойствам роду *Bordetella* соответствовали 4 культуры. Они представляли собой овоидные, коккобациллярные грамотрицательные палочки, окрашивающиеся биполярно, располагающиеся одиночно, парами, редко короткими цепочками. Все исследуемые образцы были подвижны и хорошо росли на простых и селективных питательных средах.

Результаты изучения биохимических свойств выделенных колоний представлены в табл. 4.

По биохимическим тестам роду *Bordetella* соответствовало 5 культур, которые не ферментировали сахара, не образовывали индол и продуцировали оксидазу.

В результате комплексного изучения морфологических, культуральных и биохимических свойств было выделено 4 полевых штамма *B. bronchiseptica*.

Таким образом, для выделения *B. bronchiseptica* необходимо использовать селективную среду, так как довольно трудно изолировать бордетеллы от других микроорганизмов, населяющих полость носа и глотки.

Выводы

Схема индикации и идентификации бактерий рода *Bordetella bronchiseptica* от домашних животных включает взятие глубоких мазков из глотки на селективную среду: бордетелл-агар с цефазолином и миконазолом, выделение чистых культур, микроскопию с окраской по Граму, оценку роста на обычных и селективных, жидких и плотных средах, изучение биохимических свойств (ферментация сахаров, тесты с оксидазой, уреазой и индолом) и оценку подвижности для видового типирования бордетелл.

РЕЗЮМЕ

В статье приводятся результаты разработки диагностики бордетеллёза домашних животных. Методика индикации и идентификации Bordetella bronchiseptica включает взятие глубоких мазков из глотки собак на бордетелл-агар с селективными компонентами, выделение чистой культуры и оценку морфологических, тинкториальных, биохимических и культуральных свойств бордетелл.

SUMMARY

The results of the development of methods for bordetelliosis diagnosis in pets are given in the paper. Methods for indication and identification of Bordetella bronchiseptica include the collection of deep swabs from throats of dogs for bordetel-agar with selective components, isolation of pure culture and evaluation of bordetella morphological, tinctorial, biochemical and cultural characteristics.

Литература

1. Лабинская, А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований /А.С. Лабинская. М.: Медицина, 1978. 394 с.
2. Определитель бактерий Берджи: в 2-х т.: пер. с англ. / под ред. Дж. Хоулта и др. М.: Мир, 1997. 800 с.
3. Feline bordetellosis: prevalence and risk factors for infection / S.H. Binns, S. Dawson, A.J. Speakman [et al.] // Veterinary Record. 1999. №17. P. 458-461.
4. Bromberg, K. Detection of Bordetella pertussis associated with the alveolar macrophages of children with immunodeficiency virus infection. /K. Bromberg, G. Tannis, P. Steiner // Infect. Immun. 1991. №59. P. 4715-719.
5. Dworkin, M.S. Bordetella bronchiseptica infection in human immunodeficiency virus-infected patients / M.S. Dworkin, P.S. Sullivan, S.E. Buskin [et al.] // Clin Infect Dis. 1999. №28. P. 95-99.
6. Gueirard, P. Intranasal inoculation of Bordetella bronchiseptica in mice induces long-lasting antibody and T cell-mediated immune responses /P. Gueirard, P. Minoprio, N. Guiso //Scand. J. Immun. 1996. Vol. 43. P. 181-192.
7. Kattar, M.M. Application of 16S rRNA gene sequencing to identify Bordetella hinzii as the causative agent of fatal septicemia / M.M. Kattar, J.F. Chavez, A.P. Limaye [et al.] // J. Clin. Microbiol. 2000. Vol. 38. P. 789-794.
8. Kristensen, K.H., Eri familieepidemi forarsaget af kighostebakterien Bordetella bronchiseptica. / K.H. Kristensen, H. Lautrop // Ug-eskr. Laeg. 1962. Vol. 124. P. 303-308.
9. Woolfrey, B.F, Human infections associated with Bordetella bronchiseptica. / B.F Woolfrey, J. Moody // Clin Microbiol Rev. 1991. Vol. 4. P. 243-55.
10. Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NF-κB activation by the Bordetella type III secretion system / M.H. Yuk, E.T. Harvill, P.A. Cotter, J.F. Miller // Mol. Microbiol. 2000. Vol. 35. P. 991-1004.